

## NOUVEL AGENT ANTI-ANGIOGÉNIQUE ET SON UTILISATION, NOTAMMENT DANS LE CADRE DU TRAITEMENT DES CANCERS

5 La présente invention a pour objet un nouvel agent anti-angiogénique, ainsi que son utilisation, notamment dans le cadre du traitement des cancers.

L'angiogenèse est un processus de croissance de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Trois phénomènes particuliers sont notamment à la base de ce processus : la prolifération, la migration et la différenciation (la tubulogenèse) des cellules endothéliales. L'angiogenèse est activée par certains facteurs de croissances, dits facteurs angiogéniques, tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*, facteur de croissance endothélial vasculaire), le FGF-1 (*Fibroblast Growth Factor 1*, facteur de croissance des fibroblastes 1) ou le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*, facteur de croissance des fibroblastes 2).

15 En temps normal, l'angiogenèse est essentiellement restreinte au système reproducteur femelle et à la cicatrisation des plaies. Cependant, l'angiogenèse est également impliquée dans de nombreux cas pathologiques, tels que la rétinopathie diabétique, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, et les cancers. En effet, dans ce dernier cas il a été montré que la croissance tumorale était grandement favorisée par l'apparition au sein de ces tumeurs d'une néo-vascularisation résultant en particulier de la sécrétion par les tumeurs de facteurs angiogéniques.

20 De nombreuses tentatives de traitements thérapeutiques basées sur l'utilisation de protéines anti-angiogéniques sont en cours. Parmi ces composés, l'un des plus prometteur est l'endostatine (O'Reilly et al., 1997), qui est actuellement en essais cliniques de phase I (Herbst et al., 2002). L'endostatine est une protéine de 20 kDa correspondant à un fragment du collagène XVIII. Le mécanisme d'action de l'endostatine reste inconnu.

30 Certaines tentatives thérapeutiques reposent sur l'élucidation de mécanismes d'action connus. Ainsi les cellules endothéliales en prolifération expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  alors que les cellules endothéliales quiescentes ne l'expriment pas (Brooks, 1994). Cette observation a permis de mettre au point des inhibiteurs de cette molécule actuellement en cours d'essais cliniques.

Parmi tous les acteurs moléculaires impliqués dans l'activation de l'angiogenèse, seul le VEGF a fait la preuve de son efficacité dans pratiquement tous les modèles expérimentaux de mesure d'activité de l'angiogenèse (Ortége, 1999). De plus, au printemps 2003, il a été rendu public par la société Genentech que des anticorps anti-VEGF exerçaient une activité anti-tumorale chez les malades atteints de cancer du colon. Ainsi donc il est de toute première importance de rechercher des molécules pouvant se lier au VEGF et par là même d'exercer une activité anti-tumorale comparable à celle des anticorps anti-VEGF.

Le gène *nov*, tout d'abord identifié dans des néphroblastomes aviaires (Joliot et al., 1992 ; Martinerie et Perbal, 1991), a été cloné chez l'homme (*novH*)(Martinerie et al., 1994), la souris (*novM*)(Snaith et al., 1996) et *Xenopus laevis* (Ying et Ling, 1996). La protéine NOV, codée par le gène *nov*, dont la fonction est à ce jour inconnue, appartient à la famille CCN (Bork, 1993) qui comprend les protéines suivantes : CYR61 (Lau et Nathans, 1985), CTGF (Bradham et al., 1991), ELM-1 ou WISP-1 (Pennica et al., 1998 ; Hashimoto et al., 1998), R-COP ou WISP-2 (Pennica et al., 1998 ; Kumar et al., 1999 ; Brigstock, 1999) et WISP-3 (Pennica et al., 1998). Ces protéines sont toutes constituées de quatre domaines distincts : une protéine se liant à un facteur de croissance analogue à l'insuline (IGFBP), un domaine de répétition facteur Willebrand de type C, un domaine de répétition thrombospondine de type I et un domaine COOH-terminal. Les protéines de la famille CCN régulent différents procédés cellulaires normaux comprenant la prolifération, l'adhésion, l'apoptose et la chimiotaxie. Elles sont également impliquées dans l'implantation, la formation squelettique, le développement embryonnaire et dans différentes maladies telles que la fibrose, la cicatrisation et les cancers (Chevalier et al., 1998).

La protéine NOV humaine (NOVH) peut être détectée dans les tissus normaux (reins, muscles, cartilage, cerveau, poumons, ovaires, coeur et corticosurrénale) à différents niveaux (Joliot et al., 1992 ; Martinerie et al., 2001 ; Kocialkowski et al., 2001 ; Perbal et al., 1999) et son expression varie au cours du développement.

A ce jour les fonctions exercées par la protéine NOV ne sont pas clairement établies. Il a été récemment proposé que NOV pourrait exercer une action proangiogénique (Lin, 2003) en permettant de se lier à certaines intégrines ( $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$ ). De plus ces auteurs montrent que NOV exerce une activité proangiogénique dans le modèle de cornée de lapin. Cependant, il a été démontré que cet essai peut

conduire à des résultats faussement positifs par relargage de facteurs angiogéniques synthétisés et stockés dans la cornée (Plouët, 1997).

Ainsi la présente invention résulte de la mise en évidence de l'activité anti-angiogénique de NOV du fait de sa liaison à VEGF.

5 La présente invention a pour but de fournir un nouvel agent anti-angiogénique ayant un nouveau mécanisme d'action.

La présente invention concerne l'utilisation :

– d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, ou

10 \* un fragment de cette protéine, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

15 \* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

20 \* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

25 – d'une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par une séquence nucléotidique codant :

\* soit pour la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour un fragment de la protéine NOV tel que défini ci-dessus,

30 \* soit pour une séquence dérivée de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour une séquence homologue de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

ladite séquence nucléotidique correspondant notamment à la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour SEQ ID NO : 2, ou à la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour SEQ ID NO : 4, ou à la séquence SEQ ID NO : 5 codant pour SEQ ID NO : 6, ou à la séquence SEQ ID NO : 7 codant pour SEQ ID NO : 8, ou à la séquence SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10, ou à la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour SEQ ID NO : 12,

– d'un anticorps anti-idiotypique de la protéine NOV,  
pour la préparation d'un médicament destiné au traitement :

– de pathologies nécessitant l'inhibition de la prolifération endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi, ou

– de pathologies nécessitant l'inhibition de l'activation endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : le rejet d'allogreffe et de xénogreffe, les acrocyanoses, les sclérodermies, ou dans le cadre de la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.

La présente invention concerne l'utilisation d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, ou

\* un fragment de cette protéine, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et de préférence d'environ 40 à environ 80 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous

réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement :

– de pathologies nécessitant l'inhibition de la prolifération endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi, ou

– de pathologies nécessitant l'inhibition de l'activation endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : le rejet d'allogreffe et de xénogreffe, les acrocyanoses, les sclérodermies, ou dans le cadre de la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.

La séquence SEQ ID NO : 2 correspond à la protéine humaine NOV codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1.

La séquence SEQ ID NO : 4 correspond au fragment IGFBP (protéine se liant à un facteur de croissance analogue à l'insuline) de la protéine humaine NOV, ledit fragment étant codé par la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 3. Ce fragment comprend 72 acides aminés et correspond au fragment de la protéine NOV allant du résidu 33 au résidu 104 de la séquence SEQ ID NO : 2.

La séquence SEQ ID NO : 6 correspond au fragment VWC (domaine de répétition facteur Willebrand de type C) de la protéine humaine NOV, ledit fragment étant codé par la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 5. Ce fragment comprend 67 acides aminés et correspond au fragment de la protéine NOV allant du résidu 108 au résidu 174 de la séquence SEQ ID NO : 2.

La séquence SEQ ID NO : 8 correspond au fragment TSP-1 (domaine de répétition thrombospondine de type I) de la protéine humaine NOV, ledit fragment étant codé par la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7. Ce fragment comprend 45 acides aminés et correspond au fragment de la protéine NOV allant du résidu 206 au résidu 250 de la séquence SEQ ID NO : 2.

La séquence SEQ ID NO : 10 correspond au fragment CT (domaine COOH-terminal) de la protéine humaine NOV, ledit fragment étant codé par la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 9. Ce fragment comprend 75 acides aminés et correspond au fragment de la protéine NOV allant du résidu 264 au résidu 338 de la séquence SEQ ID NO : 2.

La séquence SEQ ID NO : 12 correspond au fragment C-terminal de la protéine humaine NOV, ledit fragment étant codé par la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 11. Ce fragment comprend 170 acides aminés et correspond au fragment de la protéine NOV allant du résidu 188 au résidu 357 de la séquence SEQ ID NO : 2.

5 L'activité d'inhibition de l'angiogenèse est également désignée activité anti-angiogénique. Cette activité peut être par exemple mise en évidence *in vitro* en démontrant l'inhibition à la fois de la multiplication, de la migration et de la différenciation, de cellules endothéliales par les séquences peptidiques de l'invention. La mesure de l'inhibition de la multiplication des cellules endothéliales peut être  
10 réalisée en cultivant des cellules endothéliales en présence de la séquence peptidique dont on souhaite évaluer l'activité. La mesure de l'inhibition de la migration des cellules endothéliales peut être réalisée en effectuant une « blessure » sur un tapis de cellules endothéliales et en incubant ensuite les cellules en présence de la séquence peptidique à tester. On mesure alors le nombre de cellules ayant migré sur la blessure.  
15 La mesure de l'inhibition de la différenciation (tubulogenèse) des cellules endothéliales peut être réalisée en mesurant la longueur de tubules formés par des cellules endothéliales cultivées sur gel en présence de la séquence peptidique à tester.

Parmi les modèles classiques de mesure d'angiogenèse, on peut citer les modèles par délivrance locale comme :

- 20 – l'injection sous-cutanée de Matrigel (Becton Dickinson) imprégné du composé de l'invention (Inoki et al., 2002), ou
- le dépôt sur la membrane chorio-allantoïdienne de poulet d'un implant contenant un composé de l'invention (Celerier et al., 2002).

Le composé de l'invention peut être injecté par voie systémique (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée) à des animaux chez qui on a créé une maladie  
25 angiogénique expérimentale. Le composé de l'invention peut aussi être injecté directement dans une tumeur. Alternativement la protéine NOV ou les fragments ou les anticorps anti-idiotypiques selon l'invention (décrits ci-après) peuvent être délivrés par une méthode de thérapie génique par voie locale ou systémique par toute méthode  
30 permettant l'expression de la protéine ou des fragments ou des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention (virus ou plasmide contenant la séquence de NOV). Alternativement la séquence de NOV ou des fragments ou des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention peut être insérée dans un plasmide qui est transfecté dans les cellules cancéreuses (ici la mesure consiste à mesurer l'évolution de tumeurs

développées à partir de cellules cancéreuses transfectées par un plasmide contenant ou non la séquence de NOV ou d'un fragment). Tous ces procédés de mesure sont notamment décrits dans l'article de Jain et al. (1997).

On désigne par activité anti-tumorale, une activité permettant d'inhiber la croissance tumorale et/ou d'induire la régression voire la disparition de tumeurs. Cette activité peut être par exemple mise en évidence *in vivo* en mesurant la masse de tumeurs, dont on a induit le développement chez la souris par injection de cellules tumorales, en présence et en absence d'administration de séquences peptidiques de l'invention et/ou d'acides nucléiques exprimant les séquences peptidiques de l'invention.

L'expression "inhibition de la prolifération endothéliale" désigne toute substance capable de freiner la prolifération de cellules endothéliales selon le test décrit plus loin (partie expérimentale).

L'expression "activation endothéliale" correspond à toute pathologie impliquant des cellules endothéliales soumises à une concentration accrue en VEGF par rapport à l'état non pathologique.

Selon un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2.

Une utilisation avantageuse selon la présente invention consiste en l'utilisation telle que définie ci-dessus d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de la prolifération endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi.

Une utilisation avantageuse selon la présente invention consiste en l'utilisation telle que définie ci-dessus d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'activation endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies

suivantes : le rejet d'allogreffe et de xélogreffe, les acrocyanoses, les sclérodermies, ou dans le cadre de la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.

Selon un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse.

Une utilisation avantageuse selon la présente invention consiste en l'utilisation telle que définie ci-dessus d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un



ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de la prolifération endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi.

Une utilisation avantageuse selon la présente invention consiste en l'utilisation telle que définie ci-dessus d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'activation endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : le rejet d'allogreffe et de xénogreffe, les acrocyanoses, les sclérodermies, ou dans le cadre de la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- \* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

- \* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

- \* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers.

La présente invention concerne également l'utilisation :

- d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- \* la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, ou

- \* un fragment de cette protéine, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 80 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 10, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

– d'une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par une séquence nucléotidique codant :

\* soit pour la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour un fragment de la protéine NOV tel que défini ci-dessus,

\* soit pour une séquence dérivée de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour une séquence homologue de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

ladite séquence nucléotidique correspondant notamment à la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour SEQ ID NO : 2, ou à la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour SEQ ID NO : 4, ou à la séquence SEQ ID NO : 5 codant pour SEQ ID NO : 6, ou à la séquence SEQ ID NO : 7 codant pour SEQ ID NO : 8, ou à la séquence SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10,

– d'un anticorps anti-idiotypique de la protéine NOV,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de la prolifération endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : les cancers, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi.

La présente invention concerne également l'utilisation

– d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, ou

\* un fragment de cette protéine, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 80 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8 ou SEQ ID NO : 10, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

— d'une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par une séquence nucléotidique codant :

\* soit pour la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour un fragment de la protéine NOV tel que défini ci-dessus,

\* soit pour une séquence dérivée de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour une séquence homologue de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

ladite séquence nucléotidique correspondant notamment à la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour SEQ ID NO : 2, ou à la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour SEQ ID NO : 4, ou à la séquence SEQ ID NO : 5 codant pour SEQ ID NO : 6, ou à la séquence SEQ ID NO : 7 codant pour SEQ ID NO : 8, ou à la séquence SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10,

— d'un anticorps anti-idiotypique de la protéine NOV,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'activation endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies

suivantes : le rejet d'allogreffe et de xélogreffe, les acrocyanoses, les sclérodermies, ou dans le cadre de la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.

La présente invention concerne une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active :

– une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, ou

\* un fragment de cette protéine, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, de préférence d'environ 40 à environ 80 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

– une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par une séquence nucléotidique codant :

\* soit pour la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour un fragment de la protéine NOV tel que défini ci-dessus,

\* soit pour une séquence dérivée de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour une séquence homologue de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

ladite séquence nucléotidique correspondant notamment à la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour SEQ ID NO : 2, ou à la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour SEQ ID NO : 4, ou à la séquence SEQ ID NO : 5 codant pour SEQ

ID NO : 6, ou à la séquence SEQ ID NO : 7 codant pour SEQ ID NO : 8, ou à la séquence SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10, ou à la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour SEQ ID NO : 12,

– un anticorps anti-idiotypique de la protéine NOV,

5 en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

10 \* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

15 \* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

20 \* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

25 en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

Une composition pharmaceutique avantageuse selon l'invention contient, à titre de substance active, le fragment TSP-1 susmentionné (SEQ ID NO : 8).

30 Une composition avantageuse selon l'invention est caractérisée en ce que l'activité d'inhibition de l'angiogenèse est mesurée selon le test de prolifération, de migration ou de différenciation, et en ce que cette activité d'inhibition correspond à un pourcentage d'inhibition compris de 20% à 100% de l'angiogenèse obtenue en présence du véhicule seul.

Les tests de prolifération, de migration et de différenciation (angiogenèse *in vitro*) sont décrits plus loin dans la partie expérimentale.

La présente invention concerne également une composition telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active la protéine NOV,  
5 représentée par la séquence SEQ ID NO : 2.

Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, la composition telle que définie ci-dessus est caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être administrée à raison d'environ 0,1 à environ 20 mg/kg/jour.

La présente invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus,  
10 pour la préparation d'une composition telle que définie ci-dessus, destinée à être administrée à raison d'environ 0,1 à environ 20 mg/kg/jour.

La présente invention concerne également une composition telle que définie ci-dessus caractérisée en ce qu'elle est administrée sous forme d'un gène, d'une protéine ou d'un peptide contenant la séquence de type TSP-1 (SEQ ID NO : 8).

15 Une composition avantageuse de l'invention est notamment administrée de préférence sous forme injectable.

### **DESCRIPTION DES FIGURES**

La Figure 1 correspond à la liaison de la forme iodée du VEGF<sub>165</sub> sur la protéine  
20 NOV.

La protéine NOV (4 µg/ml) est immobilisée sur du plastique selon les conditions décrites dans la partie expérimentale, puis incubée avec du VEGF<sub>165</sub> iodé (1 ng/puits) en absence (colonne PBS) ou présence de 2 µg/ml de VEGF<sub>165</sub> (colonne 0) ou de NOV (colonne NOV). Les résultats sont exprimés en cpm de VEGF<sub>165</sub> iodé fixé par puits,  
25 après lavage.

La Figure 2 correspond à la liaison de la forme iodée du VEGF<sub>189</sub> sur la protéine NOV.

La protéine NOV (4 µg/ml) est immobilisée sur du plastique selon les conditions  
30 décrites dans la partie expérimentale, puis incubée avec du VEGF<sub>189</sub> iodé (1 ng/puits) en absence (colonne PBS) ou présence de 2 µg/ml de VEGF<sub>189</sub> (colonne 0) ou de NOV (colonne NOV). Les résultats sont exprimés en cpm de VEGF<sub>189</sub> iodé fixé par puits, après lavage.

La Figure 3 correspond au test de migration des cellules. Les cellules sont comptées dans 8 champs et la moyenne est représentée sur l'axe des ordonnées. L'axe des abscisses correspond à la concentration de la protéine NOV en  $\mu\text{g/ml}$ . Les points représentés par des losanges correspondent aux cellules non incubées avec VEGF et les points représentés par des carrés correspondent aux cellules préalablement traitées avec du VEGF.

La Figure 4 correspond au test de prolifération des cellules. L'axe des abscisses correspond à la concentration de la protéine NOV en  $\mu\text{g/ml}$  et l'axe des ordonnées à la densité optique mesurée à 595 nm. Les points représentés par des losanges correspondent aux cellules qui n'ont pas été stimulées par le VEGF et les points représentés par des carrés correspondent aux cellules qui ont été stimulées par le VEGF.

La Figure 5 correspond au test d'adhésion des cellules FBAE. L'axe des abscisses correspond à la concentration de la protéine NOV en  $\mu\text{g/ml}$  et l'axe des ordonnées à la densité optique mesurée à 595 nm. Les points représentés par des losanges correspondent aux cellules non incubées avec VEGF et les points représentés par des carrés correspondent aux cellules préalablement traitées avec du VEGF.

Les Figures 6A et 6B représentent l'effet de NOV et de ses fragments sur la migration des cellules HUAEC stimulées avec  $\text{VEGF}_{165}$ . La Figure 6A correspond aux essais témoins avec des cellules non stimulées avec  $\text{VEGF}_{165}$  et la Figure 6B correspond aux essais avec des cellules stimulées avec  $\text{VEGF}_{165}$ . Les colonnes représentent le nombre de cellules/champs. Les colonnes blanches correspondent aux cellules témoins (sans ajout de NOV ou de l'un de ses fragments) ; les colonnes noires correspondent aux cellules stimulées en présence de NOV ; les colonnes hachurées verticalement correspondent aux cellules stimulées en présence du fragment N-terminal de NOV (acides aminés 1 à 187 de NOV) et les colonnes hachurées horizontalement correspondent aux cellules stimulées en présence du fragment C-terminal de NOV.

La Figure 7A représente l'effet de la protéine NOV ou de son fragment C-terminal sur la prolifération des HUAEC (cellules endothéliales artérielles ombilicales humaines) stimulées avec  $\text{VEGF}_{165}$ . L'axe des abscisses correspond à la concentration de la protéine NOV ou du fragment C-terminal (SEQ ID NO : 12) en  $\mu\text{g/ml}$  et l'axe des



ordonnées à la densité optique mesurée à 595 nm. La courbe en trait plein avec les carrés blancs correspond à la protéine NOV et la courbe en trait pointillé avec les carrés noirs correspond au fragment SEQ ID NO : 12.

La Figure 7B représente l'effet de la protéine NOV ou de son fragment C-terminal sur la prolifération des HUAEC stimulées avec bFGF. L'axe des abscisses correspond à la concentration de la protéine NOV ou du fragment C-terminal (SEQ ID NO : 12) en  $\mu\text{g/ml}$  et l'axe des ordonnées à la densité optique mesurée à 595 nm. La courbe en trait plein avec les carrés blancs correspond à la protéine NOV et la courbe en trait pointillé avec les carrés noirs correspond au fragment SEQ ID NO : 12.

Les Figures 8A et 8B représentent l'effet du fragment C-terminal de la protéine NOV (SEQ ID NO : 12) sur l'angiogenèse cornéenne. La Figure 8A correspond à l'injection de LPS seul et la Figure 8B à l'injection de LPS et dudit fragment C-terminal.

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

### **Matériels :**

La molécule NOV est produite par infection de cellules d'insecte SF9 par un baculovirus recombinant contenant l'ADNc correspondant (SEQ ID NO : 1)(Thibout et al., 2003).

Les isoformes de 165 et 189 acides aminés du VEGF sont produites par infection de cellules d'insecte SF9 par un baculovirus recombinant contenant l'ADNc correspondant (Plouët et al., 1997).

Des cellules endothéliales artérielles ombilicales humaines (HUAEC) ont été isolées à partir d'artères ombilicales perfusées avec du collagène (Sigma) pour digérer la membrane basale. Les cellules HUAEC ont été maintenues dans du SFM (Life Sciences) additionné de 20% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur. Les cultures souches ont reçu 1 ng/ml de VEGF chaque jour.

Des cellules endothéliales d'aorte fœtale bovine (FBAE) ont été isolées à partir d'aortes fœtales obtenues auprès d'un abattoir local. Les cellules ont été maintenues dans du DMEM glutamax (Life Sciences) additionné de 10% de sérum de veau nouveau-né (NBCS) inactivé par la chaleur, 100  $\mu\text{g/ml}$  de pénicilline et 100  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine à 37°C dans 10% de  $\text{CO}_2$  et 1 ng/ml de VEGF tous les 2 jours.

### **Interaction directe entre VEGF et NOV**

Pour la liaison à la protéine NOV immobilisée, des plaques ELISA à 96 puits ont été recouvertes de 4 µg/ml de protéine NOV dans un tampon carbonate 0,05 M à pH 9,6 pendant la nuit à 4°C. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués avec 5 mg/ml de BSA dans du tampon carbonate. Après avoir lavé deux fois les puits avec du PBS à pH 7,4, on a ajouté 1 ng de VEGF iodé à chaque puits en présence ou non de 2 µg/ml de VEGF<sub>165</sub> ou de NOV, dilués dans du PBS contenant 0,05 % de Tween 20, 0,5% de BSA, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Les puits ont été lavés 3 fois avec un mélange PBS-Tween 20 0,1%-BSA 0,5% et les protéines liées ont été solubilisées dans du NaOH 0,2M.

Les résultats de ces expériences sont représentés dans les figures 1 et 2.

La Figure 1 montre que le VEGF<sub>165</sub> iodé s'associe spécifiquement à NOV puisque l'addition de VEGF non radiomarké (VEGF) inhibe cette liaison. De même, l'addition de NOV inhibe la liaison de VEGF<sub>165</sub> radiomarké à NOV.

### **Tests de migration**

Des cellules FBAE sont inoculées dans des puits de 4 cm<sup>2</sup> à haute densité (50 000 cellules/puits). Quand la monocouche est confluite, la prolifération est arrêtée par l'incubation, pendant une nuit, en présence de DMEM sans sérum. Une blessure est alors pratiquée dans la monocouche à l'aide d'un grattoir mousse, permettant de délimiter une surface libre de toute cellule. Les monocouches sont ensuite lavées 3 fois par du DMEM pour enlever les cellules non adhérentes. Une photographie est alors prise pour délimiter la surface avant toute migration cellulaire. Les puits sont ensuite incubés en DMEM seul ou en présence de 50 ng/ml de VEGF en présence de concentrations variables de NOV. Après 24 h les puits sont lavés 3 fois et colorés au May-Grunwald-Giemsa et photographiés. Les photographies prises avant et après l'expérience sont alors superposées pour permettre le comptage des cellules ayant migré.

Les résultats de ces tests sont indiqués dans la Figure 3.

L'addition de NOV en l'absence de VEGF n'a pas d'effet sur la migration basale des cellules. En revanche, NOV inhibe l'activité du VEGF et 50% de l'effet maximal est obtenu avec une concentration de 50-100 ng/ml de NOV.

### **Tests de prolifération**

Des plaques de culture à 96 puits ont étéensemencées avec 1000 cellules FBAE par puits dans du DMEM additionné de 5% de NBCS. Les cellules ont été stimulées ou non avec 2 ng/ml de VEGF<sub>165</sub> et différentes concentrations de NOV. Au bout de 5 jours, les puits ont été rincés doucement avec du DMEM et les cellules ont été fixées dans 1% de glutaldéhyde pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules fixées ont été quantifiées par incorporation de violet cristallisé (Kueng et al., 1989) : les cellules ont été incubées dans 0,1% de violet cristallisé (Sigma) dilué dans 0,2 M de tampon borate à pH 9,5 pendant 20 minutes à température ambiante, le colorant non incorporé a été éliminé en lavant complètement les puits avec de grandes quantités d'eau et le colorant violet cristallisé incorporé a ensuite été solubilisé par 100 µl de 10% d'acide acétique par puits. Les lectures de densité optique ont été effectuées à 595 nm. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences séparées (voir Figure 4). Les valeurs indiquées sont des densités optiques moyennes de 6 puits ± SD.

La protéine NOV utilisée seule n'a pas d'effet significatif sur la prolifération basale (due au sérum seul). En revanche, la protéine NOV inhibe la prolifération induite par le VEGF sur un mode dépendant de la dose. 50% de l'effet maximal est obtenu avec une concentration de 100-200 ng/ml de NOV.

### **Tests d'adhésion cellulaire**

Des plaques ELISA à 96 puits (Nunc) ont été recouvertes de protéine VEGF<sub>165</sub> selon le protocole décrit dans l'article de Hutchings et al. (2003), diluée dans du tampon carbonate 0,05 M à pH 9,6 pendant la nuit à 4°C. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués pendant 1 heure à 37°C avec 5 mg/ml de BSA dans du tampon carbonate et lavés deux fois avec du DMEM avant les expériences. Les cellules ont été trypsinisées, lavées et remises en suspension dans 5 ml de DMEM avec 10% de SVF dans un tube de plastique non traité et incubées pendant 1 heure à 37°C avec 10% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont ensuite été concentrées par centrifugation et remises en suspension dans un mélange DMEM + 0,2% BSA sans sérum et la suspension cellulaire a été traitée pendant 20 minutes (37°C, 10% de CO<sub>2</sub>) avec la protéine NOV utilisée pour moduler l'adhésion. 40 000 cellules par puits ont été distribuées dans les puits dans un volume de 100 µl de DMEM + 0,2% de BSA. Les cellules ont été laissées adhérer à 37°C sous 10% de CO<sub>2</sub> pendant le temps voulu. Les puits ont été lavés doucement trois fois avec du DMEM pour retirer les cellules non adhérentes et les cellules adhérentes

ont été fixées avec 1% de glutaraldéhyde pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules fixées ont été quantifiées par incorporation de cristal violet (Kueng et al., 1989) : les cellules ont été incubées avec 0,1% de violet cristallisé (Sigma) dilué dans 0,2 M de tampon borate à pH 9,5 pendant 20 minutes à température ambiante, le colorant non incorporé a été éliminé en lavant complètement les puits avec de grandes quantités d'eau et le colorant cristal violet incorporé a ensuite été solubilisé par 100 µl de 10% d'acide acétique par puits (voir Figure 5).

### **Angiogenèse *in vitro***

Quatre queues de rat ont été dépiautées et disséquées pour récupérer les faisceaux blancs qui sont constitués en majeure partie de collagène de type I. Le collagène est extrait de ces fibres dans 50 ml d'acide acétique 0,5 M froid et agités sur une nuit. Le liquide est ensuite centrifugé à 5000g pendant 40 minutes et le surnageant est récupéré. L'extraction est refaite une fois avec 20 ml d'acide acétique, les surnageants sont mélangés et puis dialysés contre 1 l d'acide acétique 0,2 M. La concentration en collagène est ajustée à 3 mg/ml par pesée. La préparation des gels pour l'angiogenèse *in vitro* s'effectue sur de la glace pour conserver la solution de collagène sous forme liquide. Un ml de collagène (5 mg/ml) est mélangé à 0,5 ml de DMEM 10X (contenant une concentration 10X en antibiotiques et en glutamine), 0,9 ml de H<sub>2</sub>O stérile et 0,1 ml de bicarbonate de sodium 1M. Une fois le pH ajusté à 7,4, il est ajouté un volume égal de matrigel (Becton Dickinson). Le gel est coulé dans des puits de culture (2 mm d'épaisseur) et incubé à 37°C pour se solidifier. Les cellules sont rajoutées après 15 minutes (100 000 cellules/cm<sup>2</sup>) sur la surface du gel. Après 2 heures, les différents facteurs solubles sont ajoutés et les cellules sont observées et photographiées après 24 heures.

### **Production d'anticorps anti-idiotypiques**

Dans un premier temps on prépare un anticorps neutralisant de NOV en injectant à un animal, notamment une souris, de la protéine NOV mélangée avec de l'adjuvant complet de Freund (1 volume par volume de protéine NOV). On choisira une quantité de NOV comprise entre 1 et 200 µg/kg de poids corporel pour immuniser l'animal. La même opération est effectuée à 15 et 30 jours d'intervalle, excepté que l'adjuvant complet est remplacé par de l'adjuvant incomplet. Au jour 40 une saignée est pratiquée, le sérum est séparé et les immunoglobulines sont purifiées par toute méthode de

fractionnement habituelle, notamment précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie d'affinité pour la protéine A ou G. On mesure l'activité neutralisante des immunoglobulines par n'importe quel test décrit (liaison du VEGF iodé, prolifération, migration, adhésion cellulaire). Un lot d'immunoglobulines sera dit  
5 neutralisant quand il aura la capacité d'inhiber l'interaction de NOV avec le VEGF.

Dans un deuxième temps on prépare des anticorps anti-idiotypiques de NOV en injectant à des souris par voie sous-cutanée 1-100 µg de la préparation des immunoglobulines neutralisant l'activité de NOV précédemment décrites en association avec 100 µl d'adjuvant, notamment de l'adjuvant complet de Freund (Sigma).  
10 L'injection est répétée 15, 30 et 45 jours après. Cinquante-cinq jours après la première injection, on injecte à des souris 10 µg du même anticorps par voie intrapéritonéale. Cinquante-huit jours après la première injection, les souris sont sacrifiées et leurs rates sont prélevées et dilacérées dans du milieu ISCOVE pour libérer les splénocytes. Les splénocytes sont fusionnés avec des cellules de myélome de souris, notamment des  
15 cellules AG8X 63 (Kearney et al., 1979), et incubés à raison de 100 000 cellules/puits. La fusion s'effectue par ajout de 20 fois 50 µl de polyéthylène glycol (PEG) à 30 secondes d'intervalle. Quatre ml de milieu ISCOVE préchauffé à 37°C sont alors ajoutés goutte à goutte sur la suspension cellulaire, puis après une période d'incubation de 4 minutes à 37°C, 4 ml sont ajoutés. La suspension est centrifugée puis le culot  
20 cellulaire est alors repris dans 100 ml de milieu ISCOVE complété avec 20% de sérum de veau foetal et du HAT 1X (50X : Hypoxanthine 5 mM, Aminoptérine 20 µM et Thymidine 0,8 mM) et distribuées à raison de 100 µl par puits sur les macrophages. Après 5 jours, 100 µl de milieu HAT sont ajoutés, et entre 8 et 14 jours le milieu conditionné de chaque hybridome est prélevé pour mesurer par ELISA les anticorps dirigés contre les anticorps ayant servi d'agent immunogène, c'est à dire les anticorps anti-NOV. On mesure alors l'activité des anticorps anti-idiotypiques par un test ELISA :

Les fragments Fab des immunoglobulines anti NOV, préparés par toute technique conventionnelle, notamment une digestion à la papaïne, sont immobilisés sur des plaques de microtitration (0,1-20 µg/ml dans du tampon carbonate 50 mM pH 9,6).  
30 Après saturation des sites non spécifiques par une solution de sérum albumine diluée à 5 mg/ml dans le même tampon, les surnageants de cultures d'hybridomes sont ajoutés dilués pour moitié dans du tampon PBS contenant 0,05% de Tween 20. Après rinçages, les anticorps anti-idiotypiques sont révélés par adjonction d'une concentration appropriée d'anticorps anti-Fc de souris couplé à la peroxydase. La quantité d'anticorps

anti-idiotypique fixé est alors mesurée par révélation de la peroxydase et est proportionnelle à l'intensité de la réaction colorimétrique.

Les hybridomes sélectionnés par leur capacité à sécréter des anticorps dirigés contre des anticorps anti-NOV sont alors clonés, c'est-à-dire que les cellules sont  
5 ensemencées en condition de dilution limite (5 cellules/ml) sous un volume de 0,1 ml par puits. Le milieu est changé après 10 jours. Après 15 jours, certains puits contiennent des foyers de cellules qui se sont multipliées à partir de la cellule ensemencée au départ, donc toutes ces cellules sont identiques et sont issues du même clone. Quand la surface occupée par les cellules représente au moins la moitié de la surface totale du puits, le  
10 milieu est prélevé et analysé comme précédemment par un ELISA sur Fab anti-NOV. A ce stade on peut sélectionner les clones producteurs d'anticorps et connaître leur spécificité.

Une fois les clones identifiés, leur nature monoclonale est affirmée par l'opération classique consistant à ensemercer une plaque de 96 puits avec des cellules issues du  
15 même clone diluées en conditions limites comme précédemment. Les clones sécréteurs doivent donc tous sécréter un anticorps de même spécificité pour que l'on déclare cet anticorps monoclonal. Un troisième clonage est alors effectué exactement dans les mêmes conditions pour s'assurer que les clones sont bien monoclonaux.

Les anticorps anti-idiotypiques sont criblés par une batterie de tests, notamment  
20 par un test ELISA sur VEGF immobilisé. Du VEGF est immobilisé (0,1-10 µg/ml) dans du tampon carbonate comme précédemment et toutes les étapes de cet ELISA sont identiques à celles décrites dans l'ELISA sur Fab anti-NOV. Ce test permet de cribler parmi tous les anticorps anti-idiotypiques ceux qui miment les fonctions de la protéine NOV (SEQ ID NO : 2) ou des fragments de type TSP-1 (SEQ ID NO : 8), c'est-à-dire  
25 des anticorps reconnaissant le VEGF.

### CONSTRUCTION DE MUTANTS DE NOV

Des mutants de délétion de la protéine NOV ont été construits selon la référence (Perbal et al., 1999) et produits dans un système d'expression de baculovirus :

- 30 – N-Ter (correspond à une séquence comprenant les acides aminés 1-187 de NOV) et
- C-Ter contenant les acides aminés 188 à 357 (cette séquence contient le domaine de type thrombospondine (SEQ ID NO : 8) et le domaine C-terminal riche en cystéines (SEQ ID NO : 10).

**Tests de migration** (Figure 6)

Des cellules HUAEC sont inoculées dans des puits de 4 cm<sup>2</sup> à haute densité (50 000 cellules/puits). Quand la monocouche est confluite, la prolifération est arrêtée par l'incubation, pendant une nuit, en présence de SFM avec 1% de NBCS. Une blessure est alors pratiquée dans la monocouche à l'aide d'un grattoir mousse, permettant de délimiter une surface libre de toute cellule. Les monocouches sont ensuite lavées 3 fois par du SFM pour enlever les cellules non adhérentes. Une photographie est alors prise pour délimiter la surface avant toute migration cellulaire. Les puits sont ensuite incubés en SFM seul ou en présence de 50 ng/ml de VEGF en présence de concentrations variables de NOV ou de ses fragments N-Ter ou C-Ter. Après 24 h les puits sont lavés 3 fois et colorés au May-Grunwald-Giemsa et photographiés. Les photographies prises avant et après l'expérience sont alors superposées pour permettre le comptage des cellules ayant migré.

Les résultats de ces tests sont indiqués dans la Figure 6.

L'addition de NOV ou du fragment N-Ter en l'absence de VEGF n'a pas d'effet sur la migration basale des cellules. NOV inhibe l'activité du VEGF et 50% de l'effet maximal est obtenu avec une concentration de 50-100 ng/ml de NOV. Le fragment N-Ter n'exerce pas d'activité inhibitrice. En revanche, le fragment C-Ter inhibe la migration des cellules HUAEC.

Ces expériences démontrent que la séquence de NOV comprenant les acides aminés 188 à 357 est bien responsable de l'activité d'inhibition de l'angiogenèse due au VEGF et qu'elle induit une activité inhibant la migration y compris en absence de VEGF.

**Tests de prolifération** (Figure 7)

Des plaques de culture à 96 puits ont étéensemencées avec 2000 cellules HUAEC par puits dans du milieu SFM additionné de 10% de NBCS. Les cellules ont été stimulées ou non avec 2 ng/ml de VEGF<sub>165</sub> et différentes concentrations de NOV ou du fragment C-Ter. Au bout de 5 jours, les puits ont été rincés doucement avec du milieu SFM et les cellules ont été fixées dans 1% de glutaldéhyde pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules fixées ont été quantifiées par incorporation de violet cristallisé : les cellules ont été incubées dans 0,1% de violet cristallisé (Sigma) dilué dans 0,2 M de tampon borate à pH 9,5 pendant 20 minutes à température ambiante, le

colorant non incorporé a été éliminé en lavant complètement les puits avec de grandes quantités d'eau et le colorant violet cristallisé incorporé a ensuite été solubilisé par 100 µl de 10% d'acide acétique par puits. Les lectures de densité optique ont été effectuées à 595 nm. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences séparées (voir Figure 7). Les valeurs indiquées sont des densités optiques moyennes de 6 puits ± SD.

La protéine NOV inhibe la prolifération induite par le VEGF et le FGF sur un mode dépendant de la dose. 50% de l'effet maximal est obtenu avec une concentration inhibitrice de 50% de 200 ng/ml de NOV vis-à-vis du VEGF et du FGF. De même le fragment C-Ter inhibe la prolifération induite par le VEGF ou le FGF avec une concentration de 200 ng/ml.

Ces expériences démontrent que la séquence de NOV comprenant les acides aminés 188 à 357 est bien responsable de l'activité d'inhibition de l'angiogenèse. L'observation selon laquelle l'activité mitogène du FGF est aussi inhibée par le fragment NOV 188-357 démontre que l'activité inhibitrice n'est pas restreinte au seul facteur VEGF.

#### Angiogenèse de cornée

Des rats Wistar sont anesthésiés. Les cornées sont incisées et une poche cornéenne est obtenue en dilacérant l'épaisseur du stroma à l'aide d'une spatule mousse. Dans le fond de la poche est inséré un implant d'Elvax (DuPont) contenant du lipopolysaccharide, un agent inflammatoire déclenchant une réaction angiogénique dépendant de plusieurs facteurs angiogéniques. Après 8 jours une réaction angiogénique est visible en regard du limbe. Quand le fragment C-Ter est injecté dans la poche cornéenne (5 µg tous les 2 jours entre J4 et J8), la réaction angiogénique est totalement inhibée (Figure 8).

Ces expériences démontrent que le fragment C-Ter de NOV exerce une activité anti-angiogénique majeure car dépendante de l'activation de plusieurs facteurs angiogéniques.



## RÉFÉRENCES

- 5       – Bork P (1993) The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.* **327**: 125-130,
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol.* **114**:1285-1294,
- 10       – Brigstock DR (1999) The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine Rev.* **20**:189-206,
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, **264**, 569-71,
- Celerier J, Cruz A, Lamande N, Gasc JM, Corvol P (2002) Angiotensinogen and its cleaved derivatives inhibit angiogenesis. *Hypertension.* **39**(2):224-8,
- 15       – Chevalier G, Yeger H, Martinerie C, et al. (1998) nov H: Differential expression in developing kidney and in Wilms' tumors. *Am J Pathol.* **152**:1563-1575,
- Hashimoto Y, Shindo-Okada N, Tani M, et al. (1998) Expression of the Elm-1 gene, a novel gene of the CCN (CTGF, Cyr61/Cefl0 and nov) family, suppress in vivo growth and metastasis of K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med.* **187**:289-296,
- 20       – Herbst et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* **20**:3804-3814,
- Hutchings H, Ortéga N, Plouët J (2003) Extracellular matrix bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration and survival through integrin ligation. *FASEB J.* Apr 22 (Epub ahead of print)
- 25       – Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K, Okada Y (2002) Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J.* **16**(2):219-21,
- Jain RK, Schlenger K, Hockel M, Yuan F (1997) Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med.* **3**(11):1203-8,
- 30       – Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, et al. (1992) Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol.* **12**:10-21,

– Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**, 1548-50,

– Kocialkowski SY, H. Kingdom, J. Perbal, B. Schofield, PN (2001) Expression of the human NOV gene in first trimester fetal tissues. *Anat Embryol.* **203**:417-427,

– Kumar S, Hand AT, Connor JR, et al. (1999) Identification and cloning of a Connective tissue growth factor-like cDNA from human osteoblasts encoding a novel regulator of osteoblast functions. *J Biol Chem.* **274**:17123-17131,

– Lau L, Nathans D (1985) Expression of a set of growth-regulated immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA.* **84**: 1182-1186,

– Lin CJ, Leu S-J, Chen N, Tebeau CM, Lin S-X, Yeung C-H, Lau LJ, (2003) CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. *J. Biol. Chem.*, **278**, 24200-24208,

– Martinerie C, Gicquel C, Louvel A, Laurent M, Schofield P, LeBouc Y (2001) Altered expression of NovH is asociated with human adrenocortical tumorigenesis. *JCEM.* **86**:3929-3940,

– Martinerie C, Huff V, Joubert I, et al. (1994) Structural analysis of the human nov proto-oncogene and expression in Wilms tumor. *Oncogene* **9**: 2729-2732,

– Martinerie C, Perbal B (1991) Expression of a gene encoding a novel IGF binding protein in human tissues. *C R Acad Sci Paris.* **313**: 345-351,

– O'Reilly et al. (1997) *Cell* **88**:277-285,

– Ortéga N, Hutchings H, Plouët J (1999) Signal relays in the VEGF system. *Front. Biosc.*, **4**, D141-D152,

– Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, et al. (1998) WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci.* **95**:14717-14722,

– Perbal B, Martinerie C, Sainson R, Werner M, He B, Roizman B (1999) The C-terminal domain of the regulatory protein NOVH is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: a clue for a role of NOVH in cell- adhesion signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 869-874,

– Plouët J, Moro F, Coldeboeuf N, Bertagnolli S, Clamens S, Bayard F (1997) Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189 aa form by urokinase is required for its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13390-13396,

– Snaith M, Natarajan D, Taylor L, et al. (1996) Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse nov gene. *Genomics*. **38**: 425-428,

– Thibout H, Martinerie C, Creminon C, Godeau F, Boudou P, Le Bouc Y, Laurent M (2003) Characterization of NOVH in biological fluids: an enzyme immuno  
5 assay for the quantification of NOVH in sera from patients with diseases of the adrenal gland and of the nervous system. *J Clin Endocrinol Metab*. **88**(1):327-336,

– Ying Z, Ling ML (1996) Isolation and characterization of xnov, a *Xenopus laevis* ortholog of the chicken nov gene. *Gene*. **17** 1:243-248,

## REVENDICATIONS

### 1. Utilisation :

– d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

- \* la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, ou
- \* un fragment de cette protéine, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou
- \* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou
- \* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

– d'une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par une séquence nucléotidique codant :

- \* soit pour la protéine NOV telle que définie ci-dessus,
- \* soit pour un fragment de la protéine NOV tel que défini ci-dessus,
- \* soit pour une séquence dérivée de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,
- \* soit pour une séquence homologue de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

ladite séquence nucléotidique correspondant notamment à la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour SEQ ID NO : 2, ou à la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour SEQ ID NO : 4, ou à la séquence SEQ ID NO : 5 codant pour SEQ ID NO : 6, ou à la séquence SEQ ID NO : 7 codant pour SEQ ID NO : 8, ou à la

séquence SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10, ou à la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour SEQ ID NO : 12,

– d'un anticorps anti-idiotypique de la protéine NOV,  
pour la préparation d'un médicament destiné au traitement :

5           – de pathologies nécessitant l'inhibition de la prolifération endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi, ou

10           – de pathologies nécessitant l'inhibition de l'activation endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : le rejet d'allogreffe et de xélogreffe, les acrocyanoses, les sclérodermies, ou dans le cadre de la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.

2. Utilisation selon la revendication 1, d'une protéine caractérisée en ce qu'elle  
15 comprend ou est constituée par :

\* la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, ou

20           \* un fragment de cette protéine, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

25           \* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

30           \* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement :

– de pathologies nécessitant l'inhibition de la prolifération endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les rétinopathies diabétiques, la polyarthrite rhumatoïde, les angiomes, les angiosarcomes, en particulier la maladie de Castelman et le sarcome de Kaposi, ou

– de pathologies nécessitant l'inhibition de l'activation endothéliale, notamment dans le cadre des pathologies suivantes : le rejet d'allogreffe et de xénogreffe, les acrocyanoses, les sclérodermies, ou dans le cadre de la préparation de greffons entre le prélèvement et la transplantation.

3. Utilisation selon la revendication 2, d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2.

4. Utilisation selon la revendication 2, d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse.

5. Utilisation d'une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers.

6. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active :

— une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou

\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessous, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

– une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par une séquence nucléotidique codant :

\* soit pour la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour un fragment de la protéine NOV tel que défini ci-dessus,

\* soit pour une séquence dérivée de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

\* soit pour une séquence homologue de la protéine NOV telle que définie ci-dessus,

ladite séquence nucléotidique correspondant notamment à la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour SEQ ID NO : 2, ou à la séquence SEQ ID NO : 3 codant pour SEQ ID NO : 4, ou à la séquence SEQ ID NO : 5 codant pour SEQ ID NO : 6, ou à la séquence SEQ ID NO : 7 codant pour SEQ ID NO : 8, ou à la séquence SEQ ID NO : 9 codant pour SEQ ID NO : 10, ou à la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour SEQ ID NO : 12

– un anticorps anti-idiotypique de la protéine NOV,  
en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

7. Composition pharmaceutique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par :

\* un fragment de la protéine NOV, représentée par la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que ce fragment présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ledit fragment comprenant notamment d'environ 40 à environ 180 acides aminés, et étant notamment représenté par l'une des séquences suivantes SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 12, ou



\* toute séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse, ou

\* toute séquence homologue de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un fragment défini ci-dessus, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 80%, et notamment 85%, avec la région comprise entre les acides aminés en position (33) et (338) de la séquence SEQ ID NO : 2, sous réserve que cette séquence homologue présente une activité d'inhibition de l'angiogenèse,

en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

8. Composition selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active la séquence SEQ ID NO : 8.

9. Utilisation selon la revendication 1 à 5, pour la préparation d'une composition selon l'une des revendications 6 à 8, destinée à être administrée à raison d'environ 0,1 à environ 20 mg/kg/jour.

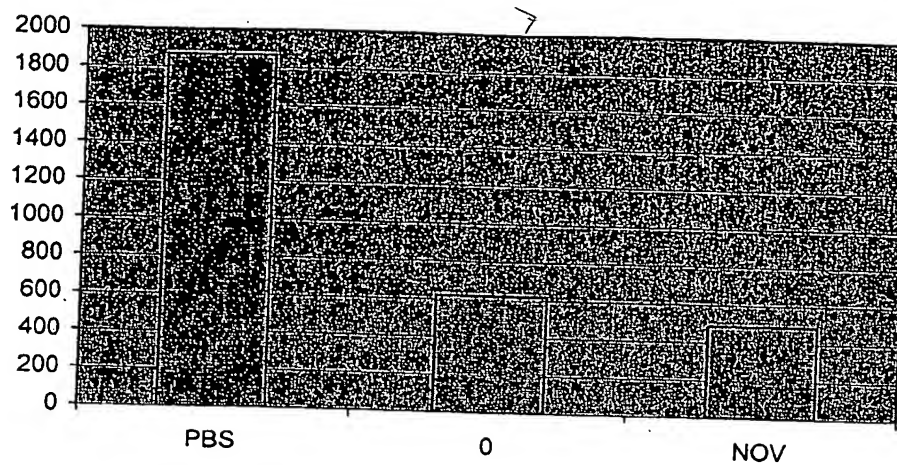


FIGURE 1

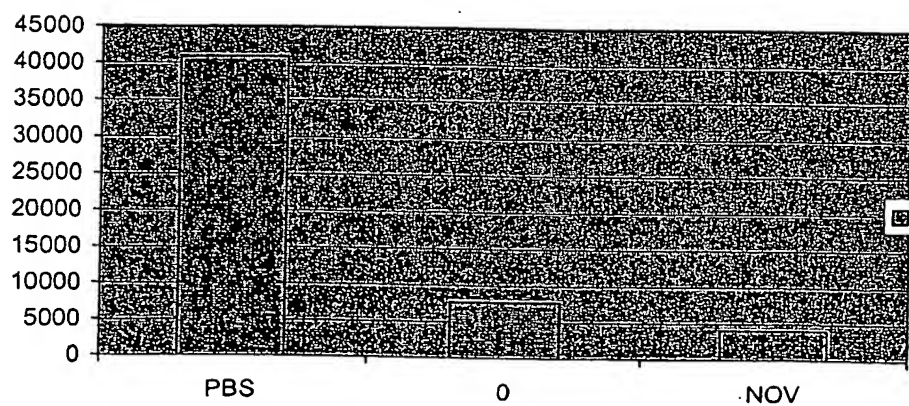


FIGURE 2

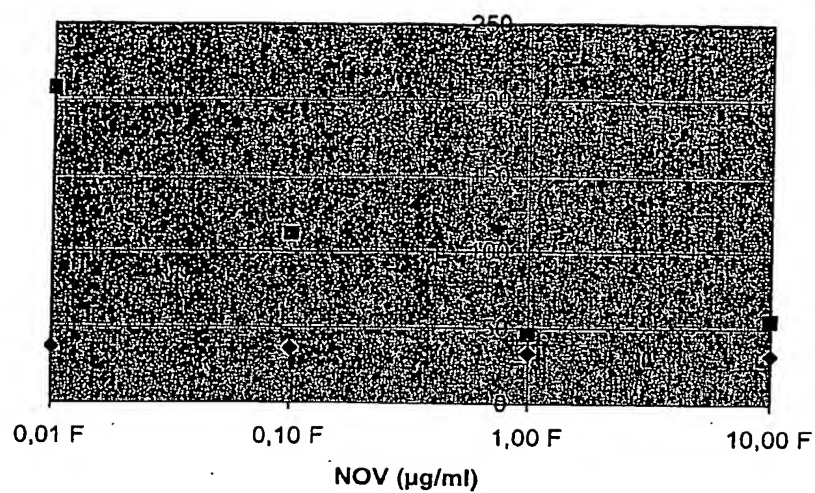


FIGURE 3

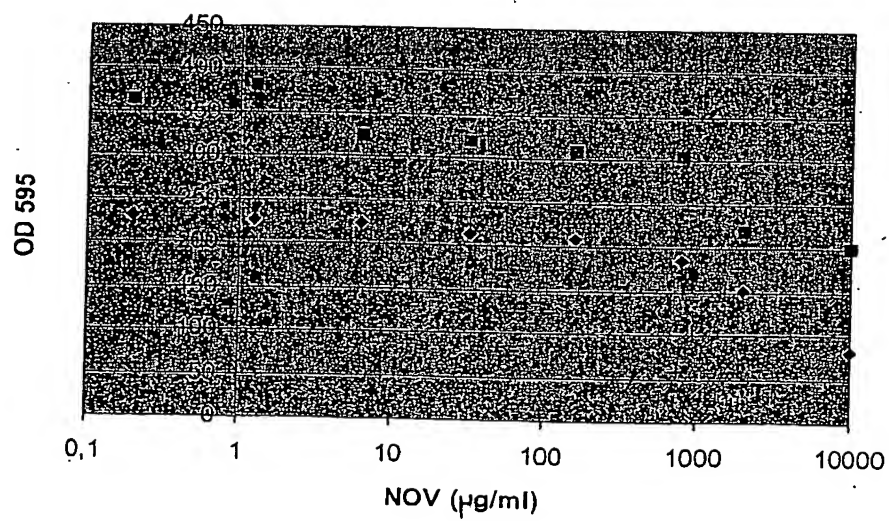


FIGURE 4

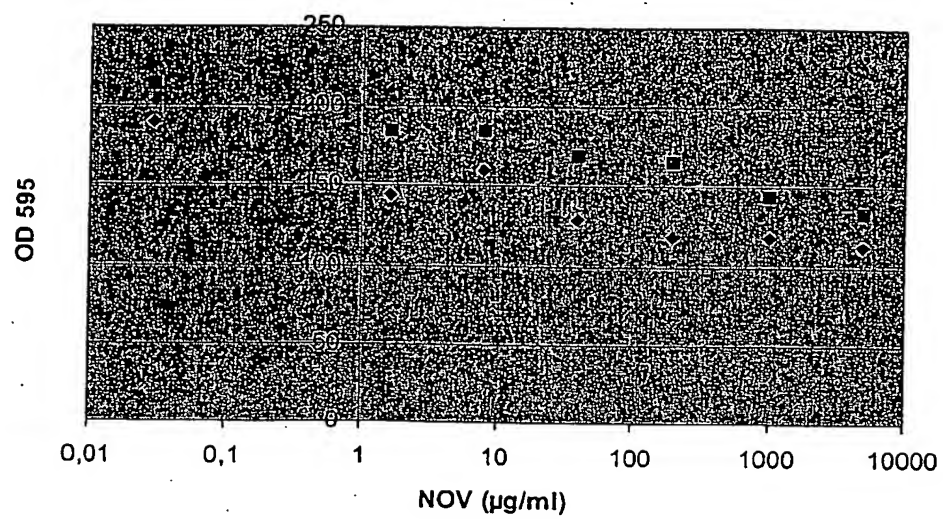


FIGURE 5

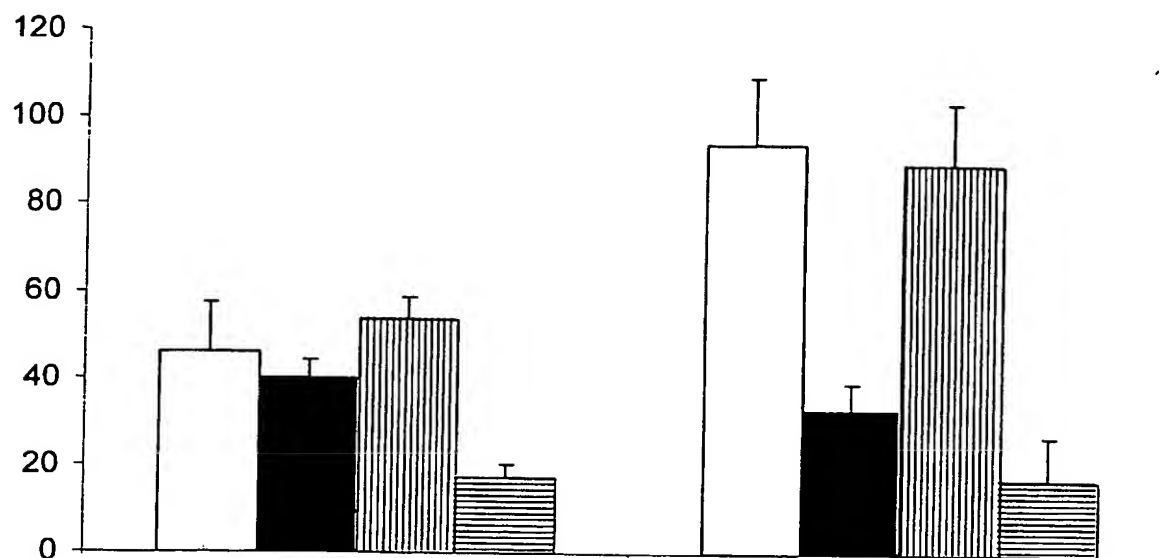


FIGURE 6A

FIGURE 6B

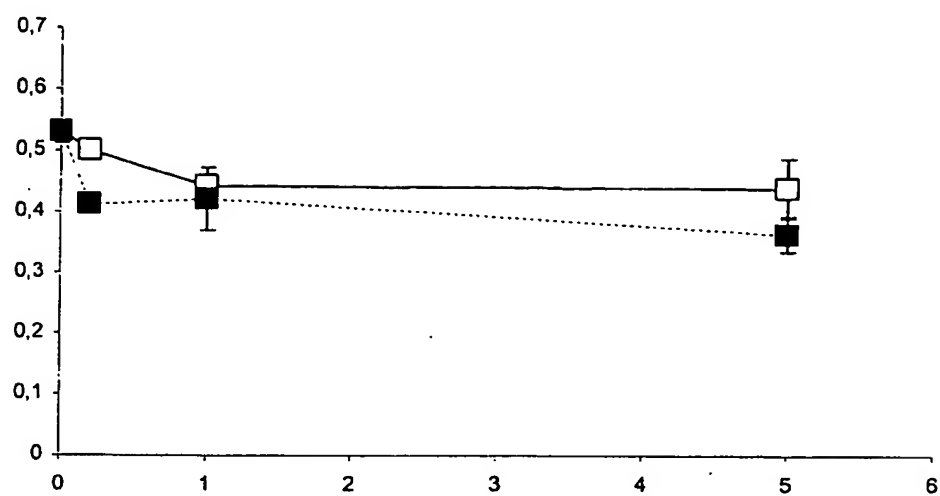


FIGURE 7A

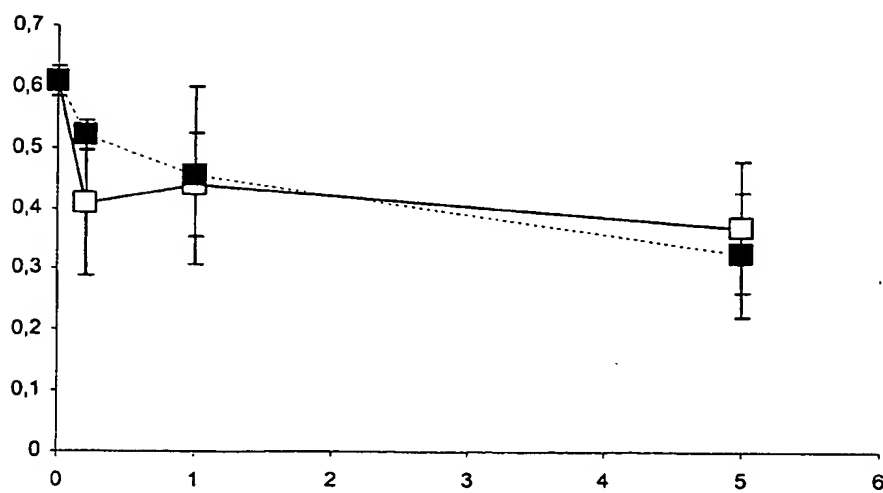
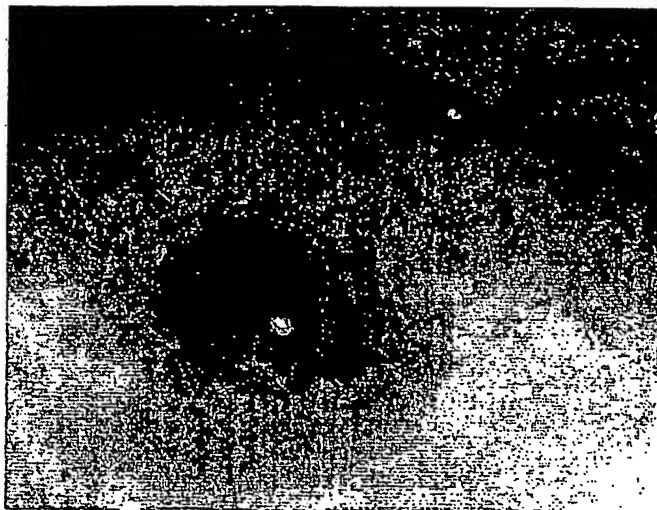
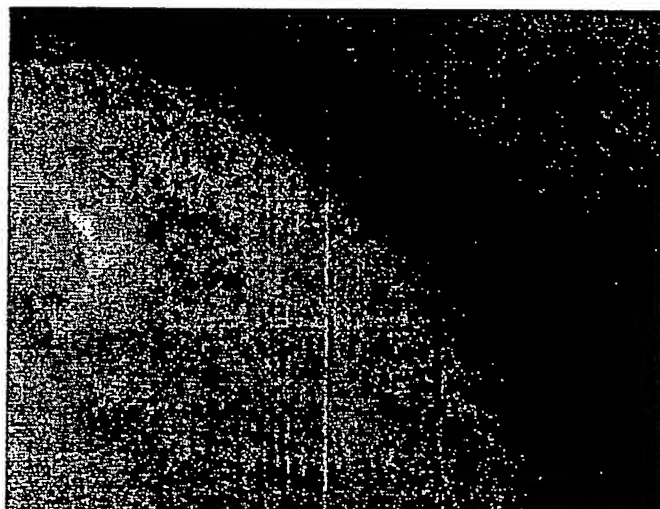


FIGURE 7B



**FIGURE 8A**



**FIGURE 8B**

IA20 Rec'd PCT/PTO 01 FEB 2006

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> NOUVEL AGENT ANTI-ANGIOGENIQUE ET SON UTILISATION,  
NOTAMMENT DANS LE CADRE DU TRAITEMENT DES CANCERS

&lt;130&gt; WOB 03 AW CNR GIOG

&lt;150&gt; FR 03/09506

&lt;151&gt; 2004-08-01

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2389

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (73)..(1143)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

gggaaggcga gcagtgccaa tctacagcga agaaagtctc gtttggtaaa agcgagaggg 60

gaaagcctga gc atg cag agt gtg cag agc acg agc ttt tgt ctc cga aag 111  
Met Gln Ser Val Gln Ser Thr Ser Phe Cys Leu Arg Lys  
1 5 10cag tgc ctt tgc ctg acc ttc ctg ctt ctc cat ctc ctg gga cag gtc 159  
Gln Cys Leu Cys Leu Thr Phe Leu Leu Leu His Leu Leu Gly Gln Val  
15 20 25gct gcg act cag cgc tgc cct ccc cag tgc ccg ggc cgg tgc cct gcg 207  
Ala Ala Thr Gln Arg Cys Pro Pro Gln Cys Pro Gly Arg Cys Pro Ala  
30 35 40 45acg ccg ccg acc tgc gcc ccc ggg gtg cgc gcg gtg ctg gac ggc tgc 255  
Thr Pro Pro Thr Cys Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Cys  
50 55 60tca tgc tgt ctg gtg tgt gcc cgc cag cgt ggc gag agc tgc tca gat 303  
Ser Cys Cys Leu Val Cys Ala Arg Gln Arg Gly Glu Ser Cys Ser Asp  
65 70 75ctg gag cca tgc gac gag agc agt ggc ctc tac tgt gat cgc agc gcg 351  
Leu Glu Pro Cys Asp Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Cys Asp Arg Ser Ala  
80 85 90gac ccc agc aac cag act ggc atc tgc acg gcg gta gag gga gat aac 399  
Asp Pro Ser Asn Gln Thr Gly Ile Cys Thr Ala Val Glu Gly Asp Asn  
95 100 105tgt gtg ttc gat ggg gtc atc tac cgc agt gga gag aaa ttt cag cca 447  
Cys Val Phe Asp Gly Val Ile Tyr Arg Ser Gly Glu Lys Phe Gln Pro  
110 115 120 125



|   |      |
|---|------|
| agc tgc aaa ttc cag tgc acc tgc aga gat ggg cag att ggc tgt gtg<br>Ser Cys Lys Phe Gln Cys Thr Cys Arg Asp Gly Gln Ile Gly Cys Val<br>130 135 140     | 495  |
| ccc cgc tgt cag ctg gat gtg cta ctg cct gag cct aac tgc cca gct<br>Pro Arg Cys Gln Leu Asp Val Leu Leu Pro Glu Pro Asn Cys Pro Ala<br>145 150 155     | 543  |
| cca aga aaa gtt gag gtg cct gga gag tgc tgt gaa aag tgg atc tgt<br>Pro Arg Lys Val Glu Val Pro Gly Glu Cys Cys Glu Lys Trp Ile Cys<br>160 165 170     | 591  |
| ggc cca gat gag gag gat tca ctg gga ggc ctt acc ctt gca gct tac<br>Gly Pro Asp Glu Glu Asp Ser Leu Gly Gly Leu Thr Leu Ala Ala Tyr<br>175 180 185     | 639  |
| agg cca gaa gcc acc cta gga gta gaa gtc tct gac tca agt gtc aac<br>Arg Pro Glu Ala Thr Leu Gly Val Glu Val Ser Asp Ser Ser Val Asn<br>190 195 200 205 | 687  |
| tgc att gaa cag acc aca gag tgg aca gca tgc tcc aag agc tgt ggt<br>Cys Ile Glu Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser Cys Gly<br>210 215 220     | 735  |
| atg ggg ttc tcc acc cgg gtc acc aat agg aac cgt caa tgt gag atg<br>Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys Glu Met<br>225 230 235     | 783  |
| ctg aaa cag act cgg ctc tgc atg gtg cgg ccc tgt gaa caa gag cca<br>Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Gln Glu Pro<br>240 245 250     | 831  |
| gag cag cca aca gat aag aaa gga aaa aag tgt ctc cgc acc aag aag<br>Glu Gln Pro Thr Asp Lys Lys Gly Lys Lys Cys Leu Arg Thr Lys Lys<br>255 260 265     | 879  |
| tca ctc aaa gcc atc cac ctg cag ttc aag aac tgc acc agc ctg cac<br>Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys Asn Cys Thr Ser Leu His<br>270 275 280 285 | 927  |
| acc tac aag ccc agg ttc tgt ggg gtc tgc agt gat ggc cgc tgc tgc<br>Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys Ser Asp Gly Arg Cys Cys<br>290 295 300     | 975  |
| act ccc cac aat acc aaa acc atc cag gca gag ttt cag tgc tcc cca<br>Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala Glu Phe Gln Cys Ser Pro<br>305 310 315     | 1023 |
| ggg caa ata gtc aag aag cca gtg atg gtc att ggg acc tgc acc tgt<br>Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val Ile Gly Thr Cys Thr Cys<br>320 325 330     | 1071 |
| cac acc aac tgt cct aag aac aat gag gcc ttc ctc cag gag ctg gag<br>His Thr Asn Cys Pro Lys Asn Asn Glu Ala Phe Leu Gln Glu Leu Glu<br>335 340 345     | 1119 |
| ctg aag act acc aga ggg aaa atg taacctatca ctcaagaagc acacctacag<br>Leu Lys Thr Thr Arg Gly Lys Met<br>350 355  | 1173 |

```

agcacctgta gctgctgcgc caccacccat caaaggaata taagaaaagt aatgaagaat 1233
cacgatttca tccttgaatc ctatgtattt tcctaagtgt atcatatgag gacctttcat 1293
atctgtcttt tatttaacaa aaaatgtaat taactgtaaa cttggaatca aggtaagctc 1353
aggatatggc ttaggaatga cttactttcc tgtggtttta ttacaaatgc aaatttctat 1413
aaattttaaga aaacaagtat ataatttact ttgtagactg ttccacattg cactcatcat 1473
attttgttgt gcaactagtgc aattccaaga aaatatcact gtaatgagtc agtgaagtct 1533
agaatcatac ttaacatttc attgtacaag tattacaacc atatattgag gttcattggg 1593
aagattctct attggctccc tttttgggta aaccagctct gaacttccaa gctccaaatc 1653
caaggaaaca tgcagctctt caacatgaca tccagagatg actattactt ttctgtttag 1713
ttttacacta ggaaacgtgt tgtatctaca gtaatgaaat gtttactaag tggactggtg 1773
tcataaaactt tctccattta agacacattg actcctttcc aatagaaaga aactaaacag 1833
aaaactccca atacaaagat gactgggtccc tcatagccct cagacattta tatattggaa 1893
gctgctgagg cccccaagtt ttttaattaa gcagaaacag catattagca gggattctct 1953
catctaactg atgagtaaac tgaggcccaa agcacttgct tacatcctct gatagctgtt 2013
tcaaagtgtc attttgtgga attttgagaa aaatagagca aaatcaacat gactgggtgt 2073
gagagaccac acattttatg agagtgttga attattgtag acatgcccaa aacttatcct 2133
tgggccataa ttatgaaaac tcatgatcaa gatatatgtg tatacataca tgtatctggt 2193
ttgtcaggct acaaggtagg ctgcaaaatt aaatctagac attcttttaa tgccaccaca 2253
cgtgttccgc ttctctcttt taaagtattt ataaaaatat aaattgtaca ttttgtaaaa 2313
tattatgttt gatttctcta cttgtcatat cactaaataa acacgatttt attgctgaaa 2373
aaaaaaaaaa aaaaaa 2389

```

<210> 2  
 <211> 357  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 2  
 Met Gln Ser Val Gln Ser Thr Ser Phe Cys Leu Arg Lys Gln Cys Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Thr Phe Leu Leu Leu His Leu Leu Gly Gln Val Ala Ala Thr  
 20 25 30  
 Gln Arg Cys Pro Pro Gln Cys Pro Gly Arg Cys Pro Ala Thr Pro Pro  
 35 40 45  
 Thr Cys Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Cys Ser Cys Cys  
 50 55 60  
 Leu Val Cys Ala Arg Gln Arg Gly Glu Ser Cys Ser Asp Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Asp Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Cys Asp Arg Ser Ala Asp Pro Ser  
 85 90 95  
 Asn Gln Thr Gly Ile Cys Thr Ala Val Glu Gly Asp Asn Cys Val Phe  
 100 105 110  
 Asp Gly Val Ile Tyr Arg Ser Gly Glu Lys Phe Gln Pro Ser Cys Lys  
 115 120 125  
 Phe Gln Cys Thr Cys Arg Asp Gly Gln Ile Gly Cys Val Pro Arg Cys  
 130 135 140  
 Gln Leu Asp Val Leu Leu Pro Glu Pro Asn Cys Pro Ala Pro Arg Lys  
 145 150 155 160  
 Val Glu Val Pro Gly Glu Cys Cys Glu Lys Trp Ile Cys Gly Pro Asp  
 165 170 175

Glu Glu Asp Ser Leu Gly Gly Leu Thr Leu Ala Ala Tyr Arg Pro Glu  
 180 185 190  
 Ala Thr Leu Gly Val Glu Val Ser Asp Ser Ser Val Asn Cys Ile Glu  
 195 200 205  
 Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser Cys Gly Met Gly Phe  
 210 215 220  
 Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys Glu Met Leu Lys Gln  
 225 230 235 240  
 Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Gln Glu Pro Glu Gln Pro  
 245 250 255  
 Thr Asp Lys Lys Gly Lys Lys Cys Leu Arg Thr Lys Lys Ser Leu Lys  
 260 265 270  
 Ala Ile His Leu Gln Phe Lys Asn Cys Thr Ser Leu His Thr Tyr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys Ser Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His  
 290 295 300  
 Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala Glu Phe Gln Cys Ser Pro Gly Gln Ile  
 305 310 315 320  
 Val Lys Lys Pro Val Met Val Ile Gly Thr Cys Thr Cys His Thr Asn  
 325 330 335  
 Cys Pro Lys Asn Asn Glu Ala Phe Leu Gln Glu Leu Glu Leu Lys Thr  
 340 345 350  
 Thr Arg Gly Lys Met  
 355

<210> 3  
 <211> 216  
 <212> ADN  
 <213> séquence artificielle  
 <220>  
 <223> fragment de la protéine NOV  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(216)  
 <223>

<400> 3  
 cag cgc tgc cct ccc cag tgc ccg ggc cgg tgc cct gcg acg ccg ccg 48  
 Gln Arg Cys Pro Pro Gln Cys Pro Gly Arg Cys Pro Ala Thr Pro Pro  
 1 5 10 15  
 acc tgc gcc ccc ggg gtg cgc gcg gtg ctg gac ggc tgc tca tgc tgt 96  
 Thr Cys Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Cys Ser Cys Cys  
 20 25 30

tgc gac gag agc agt ggc ctc tac tgt gat cgc agc gcg gac ccc agc 192  
Cys Asp Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Cys Asp Arg Ser Ala Asp Pro Ser  
50 55 60

aac cag act ggc atc tgc acg gcg 216  
Asn Gln Thr Gly Ile Cys Thr Ala  
65 70

```
<210> 4
<211> 72
<212> PRT
<213> séquence artificielle
```

```
<220>
<223> fragment de la protéine NOV
```

<400> 4  
Gln Arg Cys Pro Pro Gln Cys Pro Gly Arg Cys Pro Ala Thr Pro Pro  
1 5 10 15

Thr Cys Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Cys Ser Cys Cys  
20 25 30

Leu Val Cys Ala Arg Gln Arg Gly Glu Ser Cys Ser Asp Leu Glu Pro  
35 40 45

Cys Asp Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Cys Asp Arg Ser Ala Asp Pro Ser  
50 55 60

Asn Gln Thr Gly Ile Cys Thr Ala  
65 70

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| <210> | 5                     |
| <211> | 201                   |
| <212> | ADN                   |
| <213> | séquence artificielle |

```
<220>
<223> fragment de la protéine NOV
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(201)
<223>
```

```
<400> 5
gat aac tgt gtg ttc gat ggg gtc atc tac cgc agt gga gag aaa ttt      48
Asp Asn Cys Val Phe Asp Gly Val Ile Tyr Arg Ser Gly Glu Lys Phe
1          5          10          15
```

cag cca agc tgc aaa ttc cag tgc acc tgc aga gat ggg cag att ggc 96  
Gln Pro Ser Cys Lys Phe Gln Cys Thr Cys Arg Asp Gly Gln Ile Gly  
20 25 30

atg ggg ttc tcc acc cgg gtc acc aat agg aac cgt caa tgt gag atg 96  
Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys Glu Met  
20 25 30

ctg aaa cag act cgg ctc tgc atg gtg cgg ccc tgt gaa 135  
Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu  
35 40 45

```
<210>      8
<211>     45
<212>     PRT
<213>     séquence artificielle
```

```
<220>
<223> fragment de la protéine NOV
```

<400> 8  
Cys Ile Glu Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser Cys Gly  
1 5 10 15

Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys Glu Met  
20 25 30

Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu  
35 40 45

```
<210> 9
<211> 225
<212> ADN
<213> séquence artificielle
```

<220>  
<223> fragment de la protéine NOV

```
<220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (225)  
<223>
```

<400> 9  
tgt ctc cgc acc aag aag tca ctc aaa gcc atc cac ctg cag ttc aag 48  
Cys Leu Arg Thr Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys  
1 5 10 15

aac tgc acc agc ctg cac acc tac aag ccc agg ttc tgt ggg gtc tgc 96  
Asn Cys Thr Ser Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys  
20 25 30

agt gat ggc cgc tgc tgc act ccc cac aat acc aaa acc atc cag gca 144  
 Ser Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala  
 35 40 45

gag ttt cag tgc tcc cca ggg caa ata gtc aag aag cca gtg atg gtc 192  
Glu Phe Gln Cys Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val  
50 55 60

att ggg acc tgc acc tgt cac acc aac tgt cct 225  
Ile Gly Thr Cys Thr Cys His Thr Asn Cys Pro  
65 70 75

<210> 10  
 <211> 75  
 <212> PRT  
 <213> séquence artificielle

<220>  
 <223> fragment de la protéine NOV

<400> 10  
 Cys Leu Arg Thr Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Asn Cys Thr Ser Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys  
 20 25 30  
 Ser Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala  
 35 40 45  
 Glu Phe Gln Cys Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val  
 50 55 60  
 Ile Gly Thr Cys Thr Cys His Thr Asn Cys Pro  
 65 70 75

<210> 11  
 <211> 510  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(510)  
 <223>

<400> 11  
 gct tac agg cca gaa gcc acc cta gga gta gaa gtc tct gac tca agt 48  
 Ala Tyr Arg Pro Glu Ala Thr Leu Gly Val Glu Val Ser Asp Ser Ser  
 1 5 10 15  
 gtc aac tgc att gaa cag acc aca gag tgg aca gca tgc tcc aag agc 96  
 Val Asn Cys Ile Glu Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser  
 20 25 30  
 tgt ggt atg ggg ttc tcc acc cgg gtc acc aat agg aac cgt caa tgt 144  
 Cys Gly Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys  
 35 40 45  
 gag atg ctg aaa cag act cgg ctc tgc atg gtg cgg ccc tgt gaa caa 192  
 Glu Met Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Gln  
 50 55 60  
 gag cca gag cag cca aca gat aag aaa gga aaa aag tgt ctc cgc acc 240  
 Glu Pro Glu Gln Pro Thr Asp Lys Lys Gly Lys Lys Cys Leu Arg Thr  
 65 70 75 80  
 aag aag tca ctc aaa gcc atc cac ctg cag ttc aag aac tgc acc agc 288  
 Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys Asn Cys Thr Ser  
 85 90 95

ctg cac acc tac aag ccc agg ttc tgt ggg gtc tgc agt gat ggc cgc 336  
 Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys Ser Asp Gly Arg  
                   100                  105                  110

tgc tgc act ccc cac aat acc aaa acc atc cag gca gag ttt cag tgc 384  
 Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala Glu Phe Gln Cys  
                   115                  120                  125

tcc cca ggg caa ata gtc aag aag cca gtg atg gtc att ggg acc tgc 432  
 Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val Ile Gly Thr Cys  
                   130                  135                  140

acc tgt cac acc aac tgt cct aag aac aat gag gcc ttc ctc cag gag 480  
 Thr Cys His Thr Asn Cys Pro Lys Asn Asn Glu Ala Phe Leu Gln Glu  
                   145                  150                  155                  160

ctg gag ctg aag act acc aga ggg aaa atg 510  
 Leu Glu Leu Lys Thr Thr Arg Gly Lys Met  
                   165                  170

<210> 12  
 <211> 170  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 Ala Tyr Arg Pro Glu Ala Thr Leu Gly Val Glu Val Ser Asp Ser Ser  
 1                  5                  10                  15

Val Asn Cys Ile Glu Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser  
                   20                  25                  30

Cys Gly Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys  
                   35                  40                  45

Glu Met Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Gln  
                   50                  55                  60

Glu Pro Glu Gln Pro Thr Asp Lys Lys Gly Lys Lys Cys Leu Arg Thr  
                   65                  70                  75                  80

Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys Asn Cys Thr Ser  
                   85                  90                  95

Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys Ser Asp Gly Arg  
                   100                  105                  110

Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala Glu Phe Gln Cys  
                   115                  120                  125

Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val Ile Gly Thr Cys  
                   130                  135                  140

Thr Cys His Thr Asn Cys Pro Lys Asn Asn Glu Ala Phe Leu Gln Glu  
                   145                  150                  155                  160

Leu Glu Leu Lys Thr Thr Arg Gly Lys Met  
                   165                  170



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**